

血清 Haptoglobin と Hemoglobin 代謝に関する研究

秋野公孝 大原弘通

札幌医科大学内科学第一講座 (主任 和田武雄教授)

Studies on serum haptoglobin and hemoglobin metabolism

Kimitaka AKINO and Hiromichi ÔHARA

*Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. T. Wada)*

In order to investigate the role of serum haptoglobin (Hp) in hemoglobin (Hb) metabolism, comparative studies between serum Hp levels and occurrences of hemosiderosis following large volumes of blood transfusion were performed clinically, and studies on the degradation of ^{59}Fe labelled Hb or ^{59}Fe labelled Hb-Hp complex by the reticuloendothelial tissues were carried out experimentally.

The results thus obtained were as follows:

1) Among 47 autopsy cases who had received blood transfusion in doses exceeding 1,000 ml, the hypohaptoglobulinemic group (less than 30 mg/100 ml) showed the significantly higher rate of 55.6% of the frequency of hemosiderosis, compared with that of 10.4% in the normo-haptoglobulinemic group. On the other hand, no case of hemosiderosis was observed in hyperhaptoglobinemia.

As to the relationship between transfusion volumes and the occurrence of hemosiderosis, no significant difference was indicated between the group which received more than 8,000 ml of transfusion volume and the group with less than 8,000 ml.

2) Degradations of ^{59}Fe labelled Hb or ^{59}Fe labelled Hb-Hp complex by the isolated stellate cell fraction, parenchymal cell fraction of the liver, and by the spleen tissue homogenate were compared against each other, and no difference of acceleration of the degradations among these cell fractions were found. However, it was, in contrast, clearly accelerated after an addition of ascorbic acid in the incubation medium.

It is concluded from these results that Hp in serum may well play a role to prevent hemosiderosis of the tissues which might occur due to relatively large volumes of blood transfusion, and that the degradation of Hb-Hp complex did not occur enzymatically, but rather by a non-enzymatical process.

赤血球の破壊によって生じた hemoglobin (以下 Hb) は heme の開環によって biliverdin となり、さらに bilirubin を形成して胆汁中に排泄されることは周知のごとくである。この Hb の代謝過程において、血管内で遊離した Hb は血清 haptoglobin (以下 Hp) と結合して Hb-Hp complex を形成する。Allison, Rees¹⁾, Laurell, Nyman²⁾, Murray ら³⁾ は、遊離 Hb が腎から排泄されるのに対して Hb-Hp complex は腎排出閾を高めて尿中への排泄を防止することを報告し、小野⁴⁾, Faulstick ら⁵⁾ は遊離 Hb よりも Hb-Hp complex の方が血中消失速度が迅速であることをみ、著者ら⁶⁾ はさらに Hb-Hp complex が主として肝星細胞で摂取されることを報告し、また山岡ら⁷⁾ は Hb-Hp complex の形成が heme の開環から biliverdin 転化への酸素添加酵素 (α -methenyl oxygenase) の基質として必要な存在であることを発表している。

しかし一方、Hb の代謝には古くから非酵素的分解が考えられ⁸⁾ ているが、酵素的分解が Hb-Hp complex 代謝にどれほどの生理的役割を果たすかについては山岡⁷⁾, 中島ら⁹⁾ の研究以外に Schmid¹⁰⁾ 一派の microsomal heme oxygenase が報告され、なお完全な解明をみていない。また complex の代謝部位として網内系組織 (肝星細胞) がどのような意義を有しているかについては、 ^{59}Fe -Hb ならびに ^{125}I -Hp の二重標識を施した Hb-Hp 複合体による西田¹¹⁾ の詳細な研究や福田ら¹²⁾ の発表があるがなお完全な解決をみるにいたっていない。

本論文はこの点に関連して、大量輸血をうけた患者の血清 Hp と hemosiderosis 発現との関係を検討し、動物実験によって肝実質細胞ならびに星細胞、および脾組織を用いて Hb および Hb-Hp complex の分解過程の研究を行った。

A. 臨床実験

血清 Hp は遊離 Hb と速やかに結合して Hb-Hp complex を形成し、腎から Hb の尿中への喪失を防ぎ、一面また腎の hemosiderosis 予防にも役立つ¹⁻³⁾。したがって低 Hp 血症ではこの complex 形成が十分でないから、結果として Hb の尿中喪失、あるいは腎、その他の組織の hemosiderosis の一因となることが推測される。

比較的大量の輸血をうけた場合には、当然生体は非生理的な大量の Hb を処理しなければならないことになるが、血清 Hp 量と hemosiderosis 発現との関係を検討した論文はこれまでにないので、その点に関連して以下の実験を行った。

実験方法

1. 対象

対象は各種の癌 20 例 (胃癌 12 例, 肺癌 2 例, その他) 急性ならびに慢性骨髄性白血病 9 例, 肝硬変症 9 例, 悪性リンパ腫・再生不良性貧血・多発性骨髄腫各 2 例, および Banti 症候群・溶血性貧血・慢性腎炎各 1 例, 計 47 例 (うち男性 34 例, 女性 13 例) の剖検例で、いずれも死亡前 1

年以内の間に 1,000 mℓ 以上の輸血をうけた例を選んだ。

2. 血清 Hp の測定

これらの対象について随時血清 Hp を測定したが、その方法としては Javid, Horowitz¹³⁾ の anisidine 染色法を用いた。

3. Hemosiderosis の検索

上述の対象 47 例について剖検時に得られた肝・腎・脾・脾等の組織の鉄染色 (ベルリン青染色) 標本によって判定したが、その場合明らかに正常のヘモジリン沈着を越える染色態度 (肝実質細胞・脾・腎にわたる) を以て (+) と判定した。

実験成績

1. 対象の血清 Hp 値と輸血量

血清 Hp 値はその型によって異なるが、これまでの正常値は西尾¹⁴⁾ も発表したがごとく 30~180 mg/100 mℓ の間である。

今回の対象 47 例のうち Hp 30 mg/100 mℓ 以下のものは 9 例, 30~180 mg/100 mℓ の間のものは 28 例, 180 mg/100 mℓ 以上のものは 10 例である。

各症例を輸血量により 1,000~4,000 mℓ, 4,000~8,000

Table 1 Occurrence of Hemosiderosis, Serum Haptoglobin Level and Blood Transfusion Volume

| Case | Age Sex | Diagnosis | Hemo-siderosis | Serum Hp level (mg/dℓ) | Volume of Blood transfusion (mℓ) |
|----------|---------|------------------|----------------|------------------------|----------------------------------|
| 1 T. S. | 68 ♂ | Rectum carcinoma | (-) | 145.9 | 2,800 |
| 2 Y. M. | 45 ♂ | Pancreas ca. | (-) | 222.2 | 3,600 |
| 3 T. Y. | 70 ♂ | Stomach ca. | (-) | 375.0 | 6,600 |
| 4 R. N. | 39 ♂ | " | (-) | 350.0 | 3,600 |
| 5 Y. S. | 52 ♂ | " | (-) | 45.0 | 11,100 |
| 6 N. S. | 67 ♂ | " | (-) | 111.0 | 3,800 |
| 7 K. T. | 74 ♂ | " | (-) | 105.5 | 2,400 |
| 8 S. K. | 56 ♂ | " | (-) | 120.1 | 7,900 |
| 9 I. T. | 62 ♂ | " | (-) | 190.8 | 4,200 |
| 10 M. T. | 69 ♂ | " | (-) | 146.0 | 1,600 |
| 11 K. T. | 35 ♂ | " | (-) | 174.1 | 2,600 |
| 12 K. S. | 40 ♂ | " | (-) | 212.1 | 3,600 |
| 13 I. F. | 58 ♀ | " | (-) | 40.0 | 7,800 |
| 14 T. N. | 57 ♀ | " | (+) | 0 | 12,400 |
| 15 K. S. | 60 ♀ | Gall bladder ca. | (-) | 164.7 | 1,200 |
| 16 M. I. | 66 ♂ | Primary hepatoma | (-) | 117.1 | 3,200 |
| 17 T. Y. | 61 ♂ | Kidney ca. | (-) | 32.0 | 35,800 |
| 18 M. Y. | 67 ♂ | Laryngeal ca. | (-) | 317.4 | 1,400 |
| 19 K. F. | 26 ♂ | Lung ca. | (-) | 116.9 | 1,200 |
| 20 S. I. | 71 ♂ | " | (+) | 159.9 | 2,000 |

| Case | Age Sex | Diagnosis | Hemo-siderosis | Serum Hp level (mg/dℓ) | Volume of Blood transfusion (mℓ) | |
|------|---------|-----------|------------------------|------------------------|----------------------------------|--------|
| 21 | M. K. | 43 ♂ | Acute myeloic leukemia | (—) | 150.0 | 5,400 |
| 22 | K. S. | 42 ♂ | ” | (—) | 43.4 | 4,800 |
| 23 | K. M. | 86 ♂ | ” | (—) | 176.5 | 6,300 |
| 24 | K. S. | 30 ♀ | ” | (—) | 39.0 | 4,400 |
| 25 | T. T. | 29 ♀ | ” | (—) | 133.1 | 17,600 |
| 26 | H. F. | 35 ♀ | ” | (—) | 0 | 15,600 |
| 27 | T. I. | 48 ♀ | ” | (—) | 228.4 | 7,400 |
| 28 | M. H. | 51 ♂ | Chronic myeloic | (—) | 186.0 | 12,000 |
| 29 | E. S. | 32 ♂ | ” leukemia | (+) | 110.0 | 49,400 |
| 30 | E. T. | 50 ♂ | Malign lymphoma | (—) | 15.0 | 5,600 |
| 31 | E. M. | 67 ♂ | ” | (—) | 112.3 | 3,600 |
| 32 | F. S. | 66 ♂ | ” | (—) | 43.1 | 1,200 |
| 33 | T. H. | 73 ♂ | ” | (—) | 40.0 | 3,000 |
| 34 | T. Y. | 78 ♂ | ” | (+) | 9.0 | 1,600 |
| 35 | M. M. | 52 ♀ | ” | (—) | 24.0 | 11,800 |
| 36 | T. I. | 46 ♀ | ” | (—) | 143.0 | 7,700 |
| 37 | M. K. | 62 ♀ | ” | (—) | 86.2 | 1,400 |
| 38 | N. O. | 56 ♀ | ” | (+) | 0 | 3,800 |
| 39 | Y. N. | 30 ♂ | Liver cirrhosis | (—) | 196.0 | 4,800 |
| 40 | Y. K. | 40 ♂ | ” | (—) | 0 | 6,800 |
| 41 | K. S. | 42 ♂ | Multiple myeloma | (—) | 51.5 | 14,800 |
| 42 | T. T. | 50 ♀ | ” | (—) | 298.6 | 4,400 |
| 43 | G. T. | 55 ♂ | Aplastic anemia | (—) | 150.0 | 6,700 |
| 44 | A. K. | 41 ♂ | ” | (—) | 151.6 | 3,200 |
| 45 | S. N. | 45 ♂ | Banti's syndrome | (+) | 0 | 11,100 |
| 46 | T. F. | 25 ♀ | Hemolytic anemia | (+) | 0 | 6,400 |
| 47 | M. O. | 48 ♀ | Chronic nephritis | (+) | 49.7 | 14,400 |

mℓ, および 8,000 mℓ 以上の 3 群に分けると, 1,000~4,000 mℓ 群 20 例, 4,000~8,000 mℓ 群 16 例, 8,000 mℓ 以上群 11 例である。

2. Hemosiderosis の有無

これらの対象について年齢, 性, 診断名, 輸血開始時血清 Hp 値および輸血量と各組織 hemosiderosis との関係を Table 1 に掲げた。

すなわち hemosiderosis の著明な例は 8 例であるが, その内訳は癌 20 例中 2 例, 白血病 9 例中 1 例, 肝硬変症 9 例中 2 例, Banti 症候群・溶血性貧血・慢性腎炎各 1 例であった。

3. 血清 Hp 値, 輸血量および hemosiderosis 出現との関係

血清 Hp 値が 30 mg/100 mℓ 未満のものを低 Hp 群, 30 ~ 180 mg/100 mℓ 間の正常域を示すものを正 Hp 群, 180

mg/100 mℓ 以上のものを高 Hp 群とし, 後二者を合わせた群と低 Hp 群との間の hemosiderosis 発現率を比較した。

Table 2 に示すごとく, hemosiderosis 陽性例は低 Hp 群では 9 例中 5 例 (55.6%), 正および高 Hp 群では 38 例中

Table 2 Occurrence of Hemosiderosis in Subjects Classified by Haptoglobin Level

| Subjects | Hemosiderosis | | Total |
|---------------------------------------|---------------|-----|-------|
| | (+) | (-) | |
| Hypo-Hp group (<30 mg/dℓ) | 5 | 4 | 9 |
| Normo- and Hyper-Hp group (≥30 mg/dℓ) | 3 | 35 | 38 |
| Total | 8 | 39 | 47 |

Table 3 Occurrence of Hemosiderosis in Subjects Classified by Blood Transfusion Volume

| Blood transfusion | Hemosiderosis | | Total |
|-------------------|---------------|-----|-------|
| | (+) | (-) | |
| ≥ 8,000 ml | 4 | 7 | 11 |
| < 8,000 ml | 4 | 32 | 36 |
| Total | 8 | 39 | 47 |

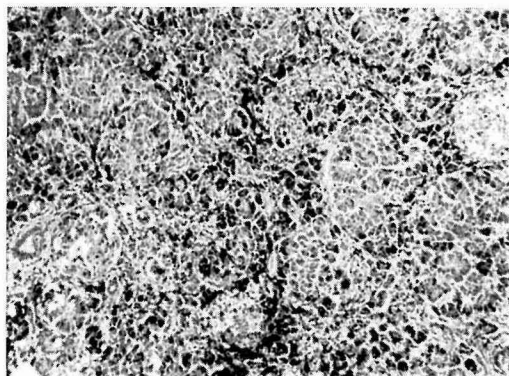
3例(7.9%)にみられ、両群間の hemosiderosis 発現に対する無相関検定結果は99.6%の確率において有意差を示した。なお正常 Hp 群のみの hemosiderosis 陽性症例は28例中3例(10.4%)で、低 Hp 群と正常 Hp 群についての hemosiderosis 発現に対する無相関検定においても98.8%の確率において両群間に有意差を認めた。なお高 Hp 群では hemosiderosis を示した例は1例もなかった。

次に輸血量を8,000 ml以上の群と8,000 ml未満の群とに分け、両群間の hemosiderosis 発現率を比較して Table 3に示した。Hemosiderosis 陽性例は8,000 ml以上輸血群では11例中4例(36.4%)にみられたが、8,000 ml未満輸血群では36例中4例(11.1%)で、両群間の hemosiderosis 発現に対する無相関検定結果は有意性を示さなかった。

また輸血量4,000 ml以下で hemosiderosis を伴った例は20例中3例(15.0%)であるが、この群と8,000 ml以上輸血群との間についてみても有意差はみられなかった。

4. Hemosiderosis 症例の検討

Hemosiderosis を示した典型例の肝組織標本を Photograph 1に示す。本例は45歳男性の Banti 症候群で、輸血量は総量11,100 ml(約3カ月間)、血清 Hp は1回のみ34 mg/100 mlと測定されたが、それ以外はすべて測定不能



Photograph 1 Hemosiderosis of the liver (Berliner blue stain).

で、死後組織の鉄染色によって肝・脾・腎・リンパ節、および胃腸粘膜に強い hemosiderosis を認めた。

小括ならびに考案

以上頻回に輸血を施された47例のうち、hemosiderosis 陽性症例は8例であるが、このうち血清 Hp 30 mg/100 ml以下のものが5例を占めた。そこで低 Hp 群と正常 Hp 群、あるいは低 Hp 群と正常～高 Hp 群との間の hemosiderosis 発現率を推計学的に検討すると、いずれの場合も低 Hp 群で hemosiderosis の発生が高い結果が得られた。

これを hemosiderosis 陽性例について輸血総量8,000 ml以上の群と4,000 ml未満の群、あるいは8,000 ml以上の群と8,000 ml未満の群との間に分けて検討したが、いずれも8,000 ml以上輸血群の方が hemosiderosis 発生の傾向は高いが、有意性を認めることは出来なかった。

以上の結果から、頻回に比較的大量の輸血を行うさいには低 Hp 血症の存在する患者では hemosiderosis を生ずる可能性が高いと結論することが出来る。

これまで輸血と hemosiderosis 発生との関係を血清 Hp 値との関連において検討した報告はみられないが、これらの相互関係を考える場合には当然基礎疾患、ないしはその病態との関係にも注目する必要がある。

今回対象とした症例について原疾患との関係を見ると、種々の癌20例中2例、白血病9例中1例に hemosiderosis がみられ、悪性リンパ腫・骨髄腫4例については全く認められていない。これらの悪性腫瘍のさいには、肝硬変症を伴う場合以外においては血清 Hp が高値を示すのが一般的な傾向¹⁵⁻¹⁸⁾であるから、その意味では原病そのものの病態に Hp 合成能の低下を伴うことはまず考えられない。あるいはそのことが、悪性腫瘍例では血清 Hp 値が多少低くても、あるレベルにその合成が保たれていて hemosiderosis を起こし難いと言えるかもしれない。

この点肝硬変症では9例中2例、また Banti 症候群・溶血性貧血ではそれぞれ1例がいずれも高い hemosiderosis を示した。肝硬変症が Hp 合成能の低下¹⁶⁻¹⁹⁾を示すことは周知のことであり、一方溶血性貧血では溶血現象に伴う Hb 処理能の亢進によって低 Hp 血症を生じ、さらに Banti 症候群ではこれらの機序のいずれにも関連をもった低 Hp 血症の生来が知られている^{16-18), 20-22)}。したがってこれらの疾患では、輸血によってより容易に hemosiderosis を招く可能性が本来存在しているとみることが出来る。慢性腎炎の1例でも hemosiderosis を認めたが、この場合の機序としては、あるいは腎の排泄機能障害がなんらかの形で関与しているかもしれない。

以上の事実から、とくに肝硬変症、溶血性貧血等では輸血によってもたらされる非生理的な Hb の処理に対して、本来低 Hp 血症が存在するために Hb-Hp complex 形成が不十分であり、そのことが肝・脾・腎その他に hemosiderosis を生じやすいと考えることが出来る

B. 動物実験

Hb 代謝に関連して著者ら⁶⁾はさきに ^{14}C -Hp-Hb complex の投与を行ったラットのオートラジオグラフによる検索で、Hb-Hp complex が摂取される場所は肝が主体であるとともに、まずはじめは肝星細胞へ多くとり込まれ、時間の経過とともに肝実質細胞へ移行する成績を報告したが、しかし ^{14}C -Hp-Hb complex がはじめ星細胞へ摂取されることの意義は不明であった。その点に関連して Hb の代謝様式の上で知られていることは、Hb が開環して鉄イオンが遊離し、肝細胞で bilirubin glucuronide 形成を経て胆汁へと排泄されることである。しかしその間の代謝経路には未詳の点が少なく、Hb-Hp complex の Hp 解離や、Hb の開環の場所についても不明である。また鉄イオンは本来細胞毒ともなり得るが、それがどこで処理されて transferrin と結合するか、また Hb の酵素的開裂機序が実際に存在するものか、などについても問題点をあげることが出来る。Hb-Hp complex が最初肝星細胞に摂取されることは、あるいはこれらの点に関与する可能性がありはせぬかも考えられるので以下の動物実験を進めたが、まずラットの肝実質細胞と肝星細胞を単離する一方、脾 homogenate を作製し、それぞれについて、 ^{59}Fe 標識 Hb および ^{59}Fe 標識 Hb-Hp complex の分解実験を行って検討した。

実験方法

1. 動物

飼育条件を一定にした体重 200 g 前後の Donryu 系雄ラットを使用した。

2. 細胞成分の単離

i) 肝実質細胞の単離

St. George ら²³⁾の方法に準じたが、すべて滅菌シリコン処理を行ったガラス器具を用いてラットの左心室にカニューレを挿入し、Lock-Versene-Heparin 液を点滴して下大静脈から流出せしめた。肝より血液が駆逐された後肝組織 2.5 g を採取し、20 mesh の金網を通して press して calcium free Lock 液 50 ml 中に浮遊させる。さらに 100 mesh の金網でこれを濾過し、原法に従って Sucrose density gradient 液上に重層する。これを 1,000 rpm 9 分間遠沈した後、上層 200 ml を注意深くすてる。肝細胞は

これを取り除いた下層 50 ml 中に含まれる。この肝細胞層を静かに pipette し、199 FCS (medium 199 に 40% の割合に fetal calf serum を加えたもの) を適量加えて冷凍保存する。実験にさいしてはこれを凍結融解し、さらに ultrasonic vibrator を 200 W, 10 分間かけて細胞破壊を行った後、その遠沈上清の蛋白濃度を Lowry 法²⁴⁾によって測定し、蛋白濃度 0.45 g/dl に調製して肝細胞液試料とした。

ii) 肝星細胞の単離

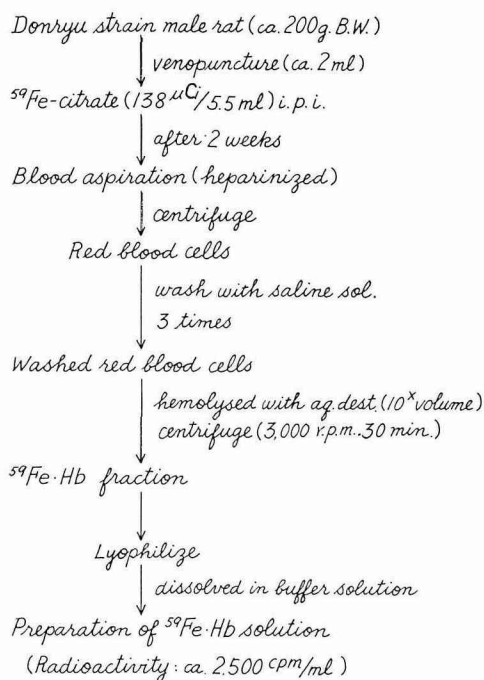
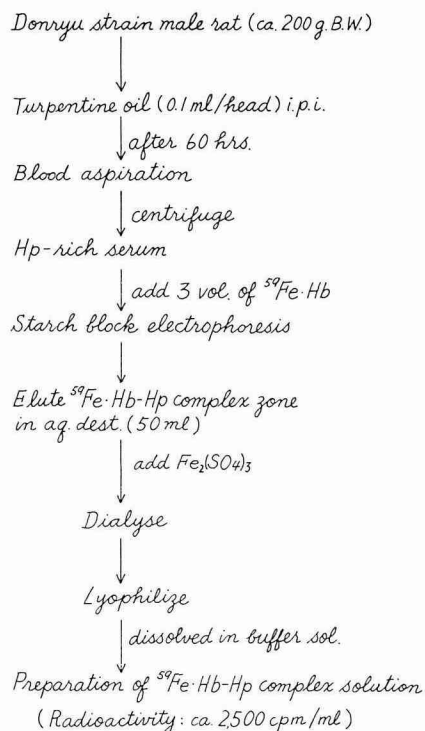
Roser²⁵⁾の方法に準じ、ラットに 200 I. U. の heparin を静注してと殺し、下大静脈から 0.04% Pronase E (科研化学) および 0.01% Deoxynucleotidase (Sigma 社) を加えた Eisen solution で肝を灌流後、肝組織を採取する。両刃カミソリで細切して再び上述酵素液に浮遊し、ゆっくり攪拌しつつ 37°C, 30 分間温浴する。これを 350 mesh 金網の 2 枚重ねを通過させ、濾液を 300 G, 8 分間遠沈し、沈渣を 199 FCS 10 ml にけん濁し、300 G, 6 分間遠沈して得られた沈渣に 20% 牛血清 albumin (比重を正確に 1.0600 \pm 0.0025 に調製) 2 ml を加えて混和後、その上に 199 FCS を静かに重層し、1,000 G, 15 分間遠沈を行う。肝星細胞は下層の牛 albumin 液 (黄色) と上層の 199 FCS 液 (淡紅色) の中間に白い層となって集積する。この層を静かに pipette して 199 FCS 5 ml で一度洗滌して遠沈し、沈渣を適量の 199 FCS を加えて凍結保存した。用いるラットの肝細胞液の場合と同様の方法で細胞破壊を行い、同様に遠沈上清の蛋白濃度を測定し、0.45 g/dl に調製して肝星細胞試料とした。

iii) 脾ホモジェネートの作製

肝灌流の場合と同様にヘパリン生食液を灌流して血液を駆逐したラットの脾を摘出し、199 FCS を加えてホモジェネートを作製した。これを適宜稀釈して蛋白濃度 0.45 g/dl のホモジェネートを調製した。

3. ^{59}Fe 標識 Hb および ^{59}Fe 標識 Hb-Hp complex の作製

ラットの頸静脈から 2 ml を採血して軽度の貧血を起こさせた後、Fig. 1 に示した操作に基づいて ^{59}Fe 標識 Hb 液を作製した。すなわち ^{59}Fe -citrate 138 μCi /5.5 ml を 3 等分し、その 1/3 ずつを 3 日間連続して腹腔内に注射した。2 週間後にヘパリン加注射器を用いて頸静脈から全採血を行い、生理的食塩水で洗滌、赤血球を溶血させた後遠沈して ^{59}Fe -Hb 原液を得る。Cyanmethemoglobin 法²⁶⁾によって Hb 濃度を測定し、生理的食塩水で稀釈して Hb 濃度が 150 mg/dl となるように ^{59}Fe -Hb 液を作製した。温浴実験にさいしては 1/20 M リン酸緩衝液 (pH 7.4, $\mu=0.2$) で稀釈し、1 ml 当りの放射活性が 2,500 cpm 前後になる

Fig. 1 Preparation of $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}$ Fig. 2 Preparation of $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ Complex

ようにした。

$^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ complex の作製は Fig. 2 に示したごとく、体重 200 g 前後のラットにテレピン油腹膜炎を催起して血清 Hp の上昇を促し、60 時間後にラットを全採血して Hp-rich serum を分離する。この血清 Hp 濃度を測定し、少量の生理的食塩水を加えてその濃度が 300 mg/dl (Hb binding capacity) となるように調製した。次いで上述の $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}$ 液 (150 mg/dl) 2.5 倍量を加えてよく混和して複合体を形成させ、リン酸緩衝液 (pH 7.4, $\mu=0.1$) を用いて澱粉ブロック電気泳動 (20 mA, 205~210 V, 21 時間) によって余剰の $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}$ と $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ とを分離し、 $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ band を出来るだけ少量の蒸溜水で溶出させて総量 50 ml を得た。この中には計算上最高 60 mg までの transferrin (Tf) が含有されている可能性があり、これが全く鉄と結合していないとすると $1.25 \mu\text{g} \times 60 = 75 \mu\text{g}$ の鉄結合能を有するものと考えられるから、イオン化率を考慮してその 2 倍量の硫酸第二鉄を加え、蒸溜水に対して 48 時間透析した (この操作は、得られた $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ complex 中に混在する Tf を完全に鉄で飽和するためで、後述の温浴実験において、 $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ complex が開環した時上清に遊離するであろう ^{59}Fe イオンが、不飽和 Tf と結合して除蛋白操作により沈澱するのを防ぐためである)。48 時間透析後の試料は凍結乾燥を行った。収量は約 180 mg であったので、後述の実験計画に基づきその 136.5 mg を 1/20 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 13 ml に、42 mg を 1/5 M 醋酸緩衝液 4 ml に溶解して温浴実験に用いた。これらの溶解液の ^{59}Fe 標識 Hb-Hp 濃度は 10.5 mg/1 ml に相当し、その放射性活性は 2,500 cpm 前後を示す。

4. 補酵素液

NADPH および NADP (いずれも Sigma 社) を生理的食塩水に溶解し、 10^{-3} M 溶液としてその 0.3 ml を温浴実験に用いた。

5. アスコルビン酸添加

リン酸緩衝液 0.5 ml にアスコルビン酸 4.05 mg を溶解したものを incubation medium に加えた。アスコルビン酸の終末濃度は 10^{-2} M である。

6. 温浴実験試料の組成

$^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ complex を基質とした場合と $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}$ を基質とした場合とに分けて実験を行った。

i) $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ complex を基質とした場合

$^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ complex を 1/20 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、incubation system に同様のリン酸緩衝液を用いて pH 7.4 で温浴を行った実験と、 $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ complex を 1/5 M 醋酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解し、incubation system に同様の醋酸緩衝液を用いて pH 5.0 で温浴を行った

実験とに分けた。

pH 7.4 における分解実験では $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ complex 1 ml に、肝星細胞試料、肝実質細胞試料、あるいは脾ホモジェネート試料をそれぞれの実験別に 0.5 ml ずつ、また NADPH もしくは NADP 溶液は 0.3 ml ずつを用い、リン酸緩衝液を加えて全量が 2.3 ml になるようにした。アスコルビン酸添加試料の場合は、緩衝液 0.5 ml に溶解したものを細胞試料の代りに添加した。これらの incubation system の組成は肝星細胞による分解実験、肝実質細胞による分解実験、および脾ホモジェネートによる分解実験別に成績と共に後に Table 4(a), (b), (c) に掲げた。

pH 5.0 における分解実験では $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ 試料の関係上脾ホモジェネートによる分解実験は割愛し、肝星細胞による分解実験と肝実質細胞による分解実験とを行った。Incubation system の組成は成績と共に Table 5(a) および (b) に掲げた。

ii) $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}$ を基質とした実験

肝星細胞による pH 7.4 の実験のみを行った。Incubation medium の組成は成績と共に Table 6 に示した。

7. 温浴実験

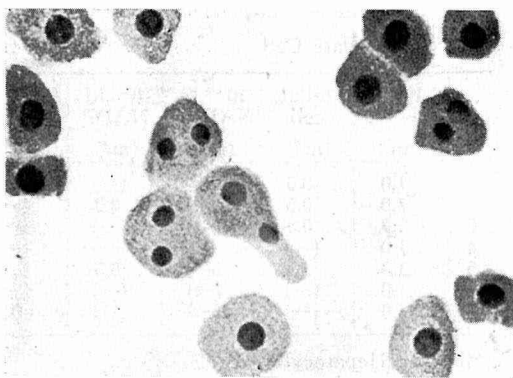
上述の各 incubation system (全量 2.3 ml) についてそれぞれ 2.0 ml ずつを正確にとり、well type scintillation counter によって放射能を測定する。次いでそれらを 37°C 、1 時間温浴後 1% スルホサリチル酸 0.5 ml を加えて混和後遠沈し、上清をすて、沈澱に 0.1 N NaOH 2.0 ml を加えて溶解し、再びその放射活性を計測し、除蛋白前のカウント数から差し引いて間接的に Hb 分解によって上清に移行した ^{59}Fe のカウント数を算出した。これによって $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ complex, あるいは $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}$ が肝星細胞、肝実質細胞等によって補酵素やアスコルビン酸存在の有無別に分解された率を比較した。すなわち、この実験では Hb の heme 開環によって起こる鉄の解離過程を調べたものである。

実験成績

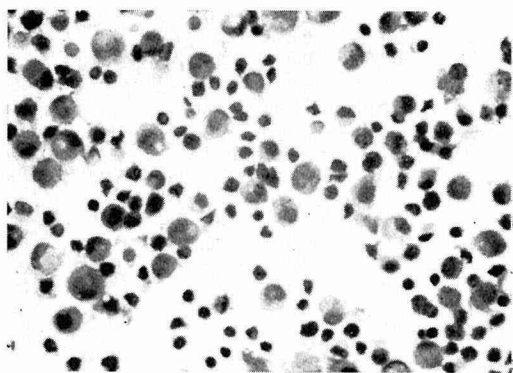
1. 単離肝細胞ならびに肝星細胞の細胞像

St. George ら²³⁾の方法で単離した肝細胞標本の光顕像を Photograph 2 に示した。写真に示すごとく、得られた肝細胞はほぼ満足すべき形態を備えており、かつ高純度の単離が得られたものと考えられる。

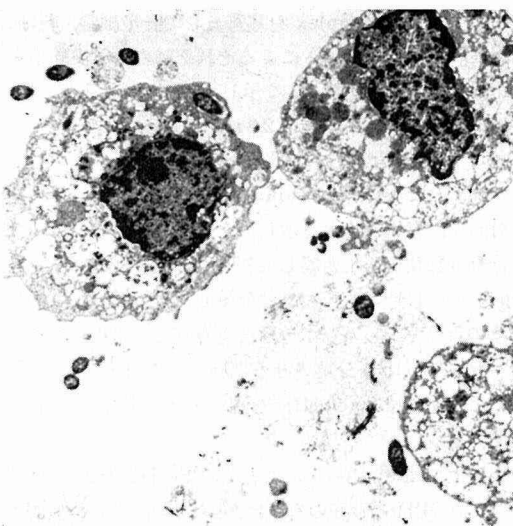
次に Roser²⁵⁾の方法により単離した肝星細胞標本の光顕像と電子顕微鏡像を Photograph 3 および Photograph 4 に示した。写真のごとく少量の肝細胞の混在を認めるが、肝星細胞の占める割合は約 75% である。電顕像の上では肝組織より単離されたため星細胞は支持組織を失って一部の変形破壊を免れないが、最適条件の試料としてこの



Photograph 2 Isolated parenchymal cells of the liver.



Photograph 3 Isolated stellate cells of the liver.



Photograph 4 Electron microscopic pattern of the isolated stellate cells.

Table 4 Experiment System of the Degradation of $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb-Hp}$ Complex ($\text{pH } 7.4$)

(a) On Stellate Cell

| | $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb-Hp}$ (mℓ) | Stellate cell (mℓ) | 10^{-3} M NADPH (mℓ) | 10^{-3} M NADP (mℓ) | Ascorbic acid (mℓ) | 1/20 M Phosphate buffer (mℓ) | Total cpm | PPT cpm | Supernat. cpm | Supernat. Total (%) |
|---|-------------------------------------------|--------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------------------|--------------|------------|------------------|---------------------------|
| 1 | 1.0 | 0.5 | 0.3 | (—) | (—) | 0.5 | 2,027 | 1,902 | 125 | 6.16 |
| 2 | 1.0 | 0.5 | (—) | 0.3 | (—) | 0.5 | 2,013 | 1,884 | 129 | 6.40 |
| 3 | 1.0 | 0.5 | (—) | (—) | (—) | 0.8 | 2,095 | 1,945 | 150 | 7.15 |
| 4 | 1.0 | (—) | 0.3 | (—) | (—) | 1.0 | 2,073 | 1,884 | 189 | 9.11 |
| 5 | 1.0 | (—) | (—) | 0.3 | (—) | 1.0 | 2,074 | 1,918 | 156 | 7.52 |
| 6 | 1.0 | (—) | (—) | (—) | (—) | 1.3 | 2,020 | 1,899 | 121 | 5.99 |
| 7 | 1.0 | (—) | (—) | (—) | 0.5 | 0.8 | 2,069 | 1,530 | 539 | 26.05 |

(b) On Hepatocyte

| | $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb-Hp}$ (mℓ) | Hepato- cyte (mℓ) | 10^{-3} M NADPH (mℓ) | 10^{-3} M NADP (mℓ) | Ascorbic acid (mℓ) | 1/20 M Phosphate buffer (mℓ) | Total cpm | PPT cpm | Supernat. cpm | Supernat. Total (%) |
|---|-------------------------------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------------------|--------------|------------|------------------|---------------------------|
| 1 | 1.0 | 0.5 | 0.3 | (—) | (—) | 0.5 | 2,000 | 1,909 | 91 | 4.55 |
| 2 | 1.0 | 0.5 | (—) | 0.3 | (—) | 0.5 | 2,106 | 2,006 | 100 | 4.74 |
| 3 | 1.0 | 0.5 | (—) | (—) | (—) | 0.8 | 2,059 | 1,928 | 131 | 6.36 |

(c) On Spleen Homogenate

| | $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb-Hp}$ (mℓ) | Spleen hemog. (mℓ) | 10^{-3} M NADPH (mℓ) | 10^{-3} M NADP (mℓ) | Ascorbic acid (mℓ) | 1/20 M Phosphate buffer (mℓ) | Total cpm | PPT cpm | Supernat. cpm | Supernat. Total (%) |
|---|-------------------------------------------|--------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------------------|--------------|------------|------------------|---------------------------|
| 1 | 1.0 | 0.5 | 0.3 | (—) | (—) | 0.5 | 2,081 | 1,921 | 160 | 7.68 |
| 2 | 1.0 | 0.5 | (—) | 0.3 | (—) | 0.5 | 2,053 | 1,901 | 152 | 7.40 |
| 3 | 1.0 | 0.5 | (—) | (—) | (—) | 0.8 | 2,164 | 1,978 | 186 | 8.59 |

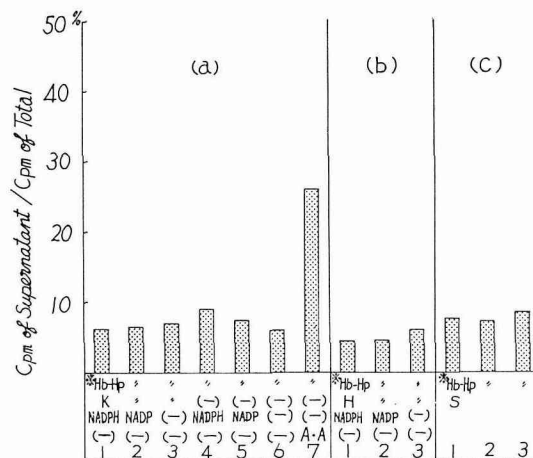
段階の細胞像のものをういざるを得なかった。

2. $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb-Hp}$ complex の各細胞成分による分解の比較と pH, 補酵素, およびアスコルビン酸の影響

i) pH 7.4 における分解

$^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb-Hp}$ complex を基質として肝星細胞, 肝細胞, および脾ホモジネートによるそれぞれの分解実験結果を Table 4(a), (b) および (c) に示した。表には incubation medium の組成, medium 2.0 mℓ の total radioactivity, スルホサリチル酸添加沈澱部の radioactivity, 両者の差から算出した上清部の radioactivity, および上清部の全放射活性に対する比率を示した。すなわち, $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb-Hp}$ が分解され開環して遊離した ^{59}Fe と, 未分解の $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb-Hp}$ とをスルホサリチル酸で分離し, 上清部に移行した ^{59}Fe の百分率から基質の分解度を算定したものである。また $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb-Hp}$ を分解させる細胞として肝星細胞成分を用いた実験成績 Table 4(a) を図示すると Fig. 3(a) のごとくである。

表および図より明らかなごとく, $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb-Hp}$ は NADP また NADPH の存在の有無にかかわらず ^{59}Fe の上清部に移行する率は 6~9% とほぼ一定しているが, 試験管 No. 7 に認められるようにアスコルビン酸を添加したもののみが



※ Hb-Hp: $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb-Hp}$ complex,
K: Stellate cell fraction,
A: A: Ascorbic acid,
H: Hepatocyte fraction,
S: Spleen homogenate.

Fig. 3 Degradation of $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb-Hp}$ complexes by stellate cell, hepatocyte and spleen homogenate.

Table 5 Experiment System of the Degradation of ⁵⁹Fe·Hb-Hp Complex (pH 5.0)

(a) On Stellate Cell

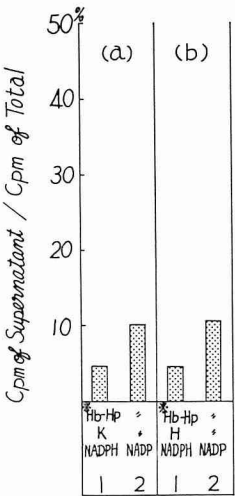
| | ⁵⁹ Fe· Hb-Hp (mℓ) | Stellate cell (mℓ) | 10 ⁻³ M NADPH (mℓ) | 10 ⁻³ M NADP (mℓ) | Ascorbic acid (mℓ) | 1/5 M Acetate buffer (mℓ) | Total cpm | PPT cpm | Supernat. cpm | Supernat. Total (%) |
|---|------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------|------------|------------------|---------------------------|
| 1 | 1.0 | 0.5 | 0.3 | (—) | (—) | 0.5 | 2,036 | 1,942 | 94 | 4.61 |
| 2 | 1.0 | 0.5 | (—) | 0.3 | (—) | 0.5 | 2,134 | 1,914 | 220 | 10.30 |

(b) On Hepatocyte

| | ⁵⁹ Fe· Hb-Hp (mℓ) | Hepato cyte (mℓ) | 10 ⁻³ M NADPH (mℓ) | 10 ⁻³ M NADP (mℓ) | Ascorbic acid (mℓ) | 1/5 M Acetate buffer (mℓ) | Total cpm | PPT cpm | Supernat. cpm | Supernat. Total (%) |
|---|------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------|------------|------------------|---------------------------|
| 1 | 1.0 | 0.5 | 0.3 | (—) | (—) | 0.5 | 2,034 | 1,946 | 88 | 4.32 |
| 2 | 1.0 | 0.5 | (—) | 0.3 | (—) | 0.5 | 2,152 | 1,918 | 234 | 10.87 |

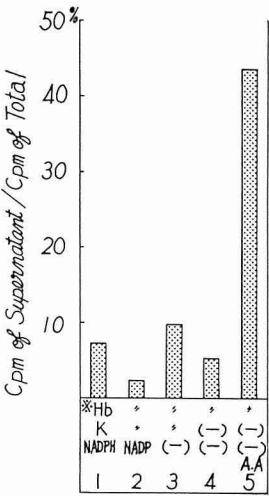
Table 6 Experiment System of the Degradation of ⁵⁹Fe·Hb with Stellate Cell (pH 7.4)

| | ⁵⁹ Fe·Hb (mℓ) | Stellate cell (mℓ) | 10 ⁻³ M NADPH (mℓ) | 10 ⁻³ M NADP (mℓ) | Ascorbic acid (mℓ) | 1/20 M Phosphate buffer (mℓ) | Total cpm | PPT cpm | Supernat. cpm | Supernat. Total (%) |
|---|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|--------------|------------|------------------|---------------------------|
| 1 | 1.0 | 0.5 | 0.3 | (—) | (—) | 0.5 | 1,965 | 1,820 | 145 | 7.37 |
| 2 | 1.0 | 0.5 | (—) | 0.3 | (—) | 0.5 | 1,926 | 1,894 | 32 | 1.66 |
| 3 | 1.0 | 0.5 | (—) | (—) | (—) | 0.8 | 2,033 | 1,836 | 197 | 9.69 |
| 4 | 1.0 | (—) | (—) | (—) | (—) | 1.3 | 1,912 | 1,809 | 103 | 5.38 |
| 5 | 1.0 | (—) | (—) | (—) | 0.5 | 0.8 | 1,857 | 1,049 | 808 | 43.51 |



※ Hb-Hp: ⁵⁹Fe·Hb-Hp complex,
K: Stellate cell fraction,
H: Hepatocyte fraction.

Fig. 4 Degradation of ⁵⁹Fe·Hb-Hp complexes by stellate cell and hepatocyte fractions.



※ Hb: ⁵⁹Fe·Hb,
K: Stellate cell fraction,
A. A: Ascorbic acid.

Fig. 5 Degradation of ⁵⁹Fe·Hb by stellate cell fraction.

26.05%と著明な分解促進を示した。試験管 No. 7 以外は肝星細胞成分を加えないものも同程度の分解を示しているから、これらは $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ の非特異的分解と考えられる。

肝細胞成分による分解実験成績 Table 4(b) を図示すると Fig. 3(b) のごとくである。また脾ホモジェネートによる分解実験成績 Table 4(c) を図示したものが Fig. 3(c) である。

図および表にみられるごとく、この実験においても NADP および NADPH の有無にかかわらず分解率は低くほぼ一定と言ってよい。Table 4(a) および Fig. 3 における細胞成分無添加試料と大同小異であるから、これも $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ の非特異的分解(自然分解)と考えられる。

ii) pH 5.0 における分解

肝星細胞成分および肝細胞成分による分解成績を Table 5(a) ならびに (b) および Fig. 4(a) ならびに (b) に示した。NADPH 添加時に比較して NADP 添加時の分解率の方がやや高い。

3. $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}$ の肝星細胞による分解と補酵素およびアスコルビン酸の影響

$^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}$ を基質として肝星細胞による pH 7.4 における分解実験成績を Table 6 および Fig. 5 に示した。

$^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}$ の分解は補酵素の有無、あるいは肝星細胞成分の有無にかかわらず分解率は 10% 以下であるが、アスコルビン酸添加の場合のみ分解率は 43.51% と著明な分解促進を示した。

小 括

臨床知見およびこれまで教室で行ってきた研究目的にそって、肝における Hb-Hp complex の細胞レベルの問題を明らかにすべく本実験を行った。すなわち肝星細胞を単離して Hb-Hp complex と Hb との分解能の比較を行ったが、この実験には比較のために肝実質細胞および脾組織による分解実験を平行して行い、また補酵素およびアスコルビン酸の影響についても検討を加えた。

Hb の開環を調べる方法としては ^{59}Fe による生体内標識を行って $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ として単離し、一方また $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}$ と Hp とを結合させて $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ を作製したが、これらを基質として前述の細胞成分と混じて温浴を行い、開環遊離した ^{59}Fe イオンの量を放射活性の比率で測定する方法をとった。このさい単離した Hb、とくに Hb-Hp complex 中に遊離 Tf の混在があると開環遊離した ^{59}Fe イオンがこれと結合してスルホサリチル酸による分離のさい沈澱に移行するおそれがあるので、これを防止するため、あらかじめ無標識 Fe イオンを加えて Tf の鉄飽和を行った。

以上の実験より得られた成績を総括すると、pH 7.4 の条件下においては $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ complex を基質とした場合であれ、 $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}$ を基質とした場合であれ、また組織系では肝実質細胞、肝星細胞、脾組織の別なく、その分解は組織を添加しない対照のそれとほとんど差異はなく、ただ組織を加えずにアスコルビン酸を添加した場合のみに著明な分解を認めるという成績が得られた。一方念のために行った pH 5.0 における実験では NADP 添加の方がやや高い分解率を示したが、大きい差異は見出せなかった。

これらの成績の示すところを考えると、in vitro における本実験系に関する限り Hb または Hb-Hp complex の開環分解は非酵素的に行われ、これにアスコルビン酸が水素供与体として重要な役割を果たすことを意味するものであり、この事実は Hb の非酵素的分解説^{8,27,28)}に一致するとみてよからう。また実験過程において $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ complex ないしは $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}$ にアスコルビン酸を加えたさいにこの沈澱蛋白は淡緑色を呈したが、これは Kaziro²⁸⁾の波長吸収像で確認された verdohemoglobin, biliverdin への転化を示すものと考えられる。Nakajima^{9,29)}の述べるごとく、NADPH 補酵素を添加した試料においても組織の存在下での分解は促進されなかったから、この場合には山岡⁷⁾、中島^{9,29)}、あるいは Tenhunen¹⁰⁾の言う酵素的分解の関与はみられないものと推測される。

本実験ではアスコルビン酸存在下の Hb の分解の方が Hb-Hp complex としてのそれよりもむしろ顕著な結果が得られたが、complex の形成によって Hb の非酵素的分解が抑制されるためであるか否かについては、即断の段階にないが興味ある点である。しかしこれはおそらくは $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}$ あるいは $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}\cdot\text{Hp}$ 試料が測定上十分な放射活性を有する実験条件を再現するには余りにも量的に制約されたため、計画を最小限に制約せざるを得なかった影響を無視出来ない。

いずれにせよ、単離した細胞レベルにおいては Hb および Hb-Hp complex は非酵素的分解をうける知見を得た。Hb-Hp complex の選択的摂取の行われる肝星細胞と Hb-Hp complex の分解との間には特異的な関連性を見出すことは出来なかった。

総 括

臨床実験上、輸血と hemosiderosis の発現率との関係を検討して、hemosiderosis の発現には輸血量の多寡よりも血中 Hp 値の多寡がより密接に関係する可能性を認めた。すなわち低 Hp 血症ないし無 Hp 血症を呈する病態の症例に頻回輸血を施した場合の hemosiderosis の発現頻度は、正常ないしは高 Hp 血症病態の症例についての輸血

による hemosiderosis の発現率よりも明らかに高率であった。この理由として、低 Hp 血症ないし無 Hp 血症は従来の報告のごとく肝硬変症や溶血性疾患等に多く、これらは明らかに Hp の合成障害や消費の亢進によって起こされることが知られているが、この点一見低 Hp 血症を呈していても今回対象の中に入った癌などでは、必ずしも Hp の合成障害や消費の亢進が肝硬変症・溶血病変に比較して顕著でないから、Hp レベルがある程度に保たれていて hemosiderosis の発生はそのことによって防止されるものと考えられた。

続いて動物実験においては、Hb-Hp complex が主として肝星細胞に摂取されるというさきに報告した知見⁶⁾を基礎として、Hb-Hp complex 代謝に対する肝星細胞の関与を中心に Hb および Hb-Hp complex の代謝を検討したが、その結果 Hp あるいは Hb-Hp complex の分解は肝星細胞、肝実質細胞、あるいは脾組織等によって特異的な分解をうけないばかりでなく、必ずしもそれらの細胞組織の存在を必要とせずにアスコルビン酸の存在下に特異的に分解が進行するという知見を得ることが出来た。

以上の in vitro 実験結果から Hb 代謝における血清 Hp の生理的意義を推測すると、血清 Hp は血行中で遊離した Hb と結合して肝星細胞への摂取を容易ならしめる^{4,6)}と考えられるが、福田ら¹²⁾は網内系への侵襲を試みた前後の実験において正常との差異を認めつつも、実験者による知見の不一致から慎重論を説き、西田¹¹⁾は Hb-Hp 複合体の代謝相の研究によって、これが肝・骨髄にとり込まれる過程と共に Hp がより早く異化され、Hb の処理がこれに遅れるズレを明らかにしているが、本複合体の肝における Hb 代謝上の役割は詳らかにされていない。

しかし一方、Hp の合成障害や溶血あるいは大量の輸血等による赤血球 catabolism の亢進した病態では、Hp の消耗と合成機序の balance が破れて Hp が欠乏し、遊離 Hb は肝における代謝経路以外に時には尿中への喪失²⁾ (hemoglobinuria, hemosiderinuria)、あるいは細胞による貪食・沈着の結果臓器組織に hemosiderosis を招来するものと考えられる。

すなわち、血清 Hp は Hb と結合することによって、Hp 代謝を生理的経路内に保つ上にも役割を演じ、その点での一つの障害が hemosiderosis の惹起をもたらす。言い換えれば頻回輸血等の場合には Hp は hemosiderosis の発生防止の上に意義を有するものと考えられる。その complex 形成がどの様にして hemosiderosis の防止に役立つかについては、その機序の一つとして小野⁴⁾の実験にもあるごとく、Hb-Hp complex は Hb よりも血中 clearance がはるかに短く、肝実質細胞へのとり込みが高まる点が注

目される。また一方では Allison¹⁾の述べるごとく高分子形成のために、Hb が他の一般の組織細胞へは入り難いことなどが考えられるが、今回の実験結果から推測されることとしては、この complex が Hb そのものよりも開裂を受け難い傾向を示したことも、あるいはその点に関係があるかもしれない。

しかしこれらの成績によると、Hb-Hp complex の開裂代謝に関して当初意図した肝星細胞による特異的な働きについては、これを証明することは出来なかった。

結 論

頻回に比較的大量の輸血をした症例にみられる hemosiderosis の発現機序に関連して血清 haptoglobin との関係を検討し、一方または単離肝細胞・脾ホモジェネート等について $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}$ および $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb-Hp complex}$ の分解実験を実施して次の結果を得た。

1. 頻回に比較的大量の輸血をうけた剖検例 47 例の臓器・組織 hemosiderosis の発現と血清 Hp 値との関係を調べ、hemosiderosis は血清 Hp レベルの低下との間に有意の相関性を示し、高率に発現することを明らかにした。

この場合輸血量そのものは必ずしも有意の関連性を示さず、むしろ原疾患との関係において肝硬変症・溶血性貧血のごとく、Hp 合成能やその消費の上の異常病態との間に関連性をうかがい得た。

2. $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb}$ および $^{59}\text{Fe}\cdot\text{Hb-Hp complex}$ を用いて肝星細胞ならびに実質細胞、脾組織ホモジェネートについてアスコルビン酸、補酵素等の影響下に温浴実験を行い、鉄イオン開裂を指標としてその分解を調べた結果、Hb および Hb-Hp complex はアスコルビン酸存在下に非酵素的に分解され、本実験系に関する限り細胞成分の存在あるいは細胞の種類別による特異的な分解の促進は認められないことを明らかにした。

3. 以上の成果にもとづき Hb 代謝に関与する Hp の役割・機序について考察を加えた。

(本研究は第 10 回日本網内系学会 (1970. 10) において発表し、文部省科学研究費 (和田) の補助の下に行われたものである)

(昭和 50. 2. 3 受理)

文 献

- 1) Allison, A. C. and Rees, W.: The binding of haemoglobin by plasma proteins (haptoglobin). Its bearing on the "Renal threshold" for Hb and the aetiology of haemoglobinuria. Brit. Med. J. 2, 1137-1143 (1957).

- 2) Laurell, C. B. and Nyman, M.: Studies on the serum haptoglobin level in hemoglobinemia and its influence on renal excretion of hemoglobin. *Blood* **12**, 493-506 (1957).
- 3) Murray, R. K., Connell, G. E. and Pert, J. H.: The role of haptoglobin in the clearance and distribution of extracorporeal hemoglobin. *Blood* **17**, 45-53 (1961).
- 4) 小野貞昭: 網内系機能と血清蛋白代謝. 血清 haptoglobin について. 札幌医誌 **26**, 141-157 (1964).
- 5) Faulstick, D. A., Lowenstein, J. and Yiengst, M. J.: Clearance kinetics of haptoglobin-hemoglobin complex in the human. *Blood* **20**, 65-71 (1962).
- 6) Wada, T., Ohara, H., Watanabe, K., Kinoshita, H. and Yachi, A.: Autoradiographic study on the site of uptake of the haptoglobin-hemoglobin complex. *J. RES* **8**, 185-193 (1970).
- 7) 山岡憲二, 中島 照: 酵素による血色素の胆汁色素への分解 (III) 特に中間産物 (656 m μ 物質) の性状. 日内会誌 **50**, 926 (1961).
- 8) Warburg, O. and Negelein, E.: Über das Absorptionsspektrum des Atmungsferments. *Bioch. Ztschr.* **214**, 64-100 (1929); 中島照: 生体の科学 **13**, 31-41 (1962) 参照.
- 9) Nakajima, H., Takemura, T., Nakajima, O. and Yamaoka, K.: Studies on hem α -methenyl oxygenase. I. The enzymatic conversion of pyridine-hemichromogen and hemoglobin-haptoglobin into a possible precursor of biliverdin. *J. Biol. Chem.* **238**, 3784-3796 (1963).
- 10) Tenhunen, R., Marver, H. S. and Schmid, R.: The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **61**, 748-755 (1968).
- 11) 西田陸夫: Hemoglobin の異化機構に関する実験的研究—二重標識 Hemoglobin-Haptoglobin 複合体の代謝について. 札幌医誌 **37**, 240-254 (1970).
- 12) 福田守道, 佐々木喬敏, 山本厚子, 西田陸夫, 漆崎一朗: 網内系と Hb 代謝—二重標識 Hb および Hb-Hp complex 異化過程と網内系機能. 日網会誌 **8**, 219-220 (1968).
- 13) Javid, J. and Horowitz, H. I.: An improved technic for the quantitation of serum haptoglobin. *Am. J. Clin. Path.* **34**, 35-38 (1960).
- 14) 西尾英昭: Haptoglobin の代謝における網内系の関与. 札幌医誌 **42**, 212-227 (1973).
- 15) Jayle, M. F., Serpicelli, J. and Robert, L.: Étude polarographique des mucoides sulfosalicylosoluble du sérum sanguin. *Clin. Chim. Acta* **1**, 452-461 (1956).
- 16) Nyman, M.: Serum haptoglobin. *Scand. J. Lab. and Invest.* **11**, Suppl. 39, 1-169 (1959).
- 17) Owen, J. A., Smith, R., Padanyi, R. and Martin, J.: Serum haptoglobin in disease. *Clin. Sci.* **26**, 1-6 (1964).
- 18) 大原弘道, 渡辺邦彦, 西尾英昭, 森田益聿, 秋野公孝, 三原藤正, 中島光男, 谷内 昭, 安斎哲郎, 和田武雄: 血清 Haptoglobin に関する臨床的ならびに生化学的研究. 第 1 報 Haptoglobin 測定 of 臨床的意義について. 最新医学 **24**, 2174-2181 (1969).
- 19) Kallai, L., Keler-Bacoka, M., Blazević, K. and Knezević, S.: The interpretation of haptoglobin values in the diagnosis of liver disease. *Gastroenterol.* **105**, 27-34 (1966).
- 20) Nosslin, B. F. and Nyman, M.: Haptoglobin determination in diagnosis of haemolytic diseases. *Lancet* **I**, 1000-1001 (1958).
- 21) Brus, I. and Lewis, S. M.: The haptoglobin content of serum in haemolytic anaemia. *Brit. J. Haematol.* **5**, 348-355 (1959).
- 22) Herman, E. C.: Serum haptoglobin in hemolytic disorders. *J. Lab. and Clin. Med.* **57**, 834-847 (1961).
- 23) St. George, S., Friedman, M. and Byers, S. O.: Mass separation of reticuloendothelial and parenchymal cells of rat's liver. *Science* **120**, 463-465 (1954).
- 24) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. and Randall, R. T.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
- 25) Roser, B.: The distribution of intravenously injected Kupffer cells in the mouse. *J. RES* **5**, 455-471 (1968).
- 26) Crosby, W. H., Munn, J. I. and Furth, F. W.: Standardizing a method for clinical hemoglobinometry. *U. S. Army Forces Med. J.* **5**, 695-703 (1954).
- 27) Lemberg, R.: Transformation of haemins into bile pigments. *Biochem. J.* **29**, 1322-1336 (1935).
- 28) Kaziro, K., Kikuchi, G. and Hanada, C.: Verdohemoglobin, an immediate precursor of biliverdin in the model reaction of hemoglobin breakdown in vitro. *J. Biochem.* **42**, 423-437 (1955).
- 29) Nakajima, H.: Studies on heme α -methenyl oxygenase. II. The isolation and characterization of the final reaction product, a possible precursor of biliverdin. *J. Biol. Chem.* **238**, 3797-3801 (1963).